

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. K. Brand

**Circadianes Verhalten der
Pyruvat-Kinase-Aktivität in der Leber
und der Blutspiegel von Insulin bei
extrem kohlenhydrat- oder proteinreich
ernährten Ratten**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Lutz Zahlmann
aus Arzberg

1980

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. K. Brand

**Circadianes Verhalten der
Pyruvat-Kinase-Aktivität in der Leber
und der Blutspiegel von Insulin bei
extrem kohlenhydrat- oder proteinreich
ernährten Ratten**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Lutz Zahlmann
aus Arzberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. K. Brand

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.1980

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1. Einleitung	1
2. Problemstellung und Versuchsplan	5
3. Material	6
3.1. Versuchstiere	6
3.2. Diäten	6
3.3. Fütterungsschema	7
3.4. Geräte	7
3.5. Chemikalien	8
4. Methoden	9
4.1. Zeitlicher Ablauf und Aufteilung der Versuchstiere	9
4.2. Gewinnung der Proben	10
4.3. Trennung der Pyruvatkinase Typ L von Typ M_2	11
4.4. Enzymaktivitätsmessungen	11
4.4.1. Pyruvatkinase	11
4.4.1.1. $v_{\max.}$ -Messung	12
4.4.1.2. $v/v_{\max.}$ -Messung	13
4.5. Insulinbestimmung	15
4.6. Proteinbestimmung	16
4.7. Statistik	16
5. Ergebnisse	17
5.1. Kontrolle des zeitlichen Verlaufs der Nahrungsaufnahme	17
5.1.1. Körpergewicht	17

5.1.2. Magengewicht	18
5.1.3. Lebergewicht	18
5.2. 24-Stunden-Profil der Aktivität der Pyruvatkinase	20
5.2.1. Bezug der Aktivität auf g Leber und Gesamtleber	20
5.2.2. Bezug der Aktivität auf mg Protein	22
5.3. Circadianes Verhalten der Substratkinetik der Pyruvatkinase Typ L	24
5.4. Circadianes Verhalten des Plasmainsulin- spiegels	27
6. Diskussion	29
7. Zusammenfassung	41
8. Literaturverzeichnis	43

A B K Ü R Z U N G E N

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
cyclo-AMP	Adenosin-3',5'-monophosphat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FbP ₂	Fructose-1,6-bisphosphat
K _{0,5}	Hill-Konstante
LDH	Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)
n	Hill-Koeffizient
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Reduziertes NAD ⁺
PEP	Phosphoenolpyruvat
TRA	Triäthanolamin
U	Enzymaktivität μmol Stoffumsatz/min
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v _{max.}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546212_0074

1. EINLEITUNG

Ein charakteristisches Merkmal lebender Systeme ist die Regulation und Koordination aller in der Zelle ablaufenden Stoffwechselprozesse. Die eng ineinander greifenden Stoffwechselketten bedürfen zahlreicher Regelmechanismen um den Ordnungszustand der Zelle aufrechtzuerhalten. Zum Teil erfolgt die Regelung in der Zelle selbst, zum Teil durch nervale Steuerung und Hormone. Die Zelle als offenes System befindet sich in einem Fließgleichgewicht mit der Umgebung und muß sich deren Bedingungen anpassen, damit es zu keiner Störung dieses Gleichgewichts kommt, was über kurz oder lang zu einer Schädigung des Gesamtorganismus führen würde.

Die Stoffwechselketten einer Zelle werden durch eine Vielfalt von Enzymen katalysiert und erreichen dadurch erst die Umsatzgeschwindigkeiten, die für ein lebendes System notwendig sind. Die Regelung der Umsatzgeschwindigkeiten obliegt den sogenannten Schrittmacherenzymen. Diese Enzyme katalysieren innerhalb einer Reaktionskette oder Kreisreaktion die Schritte mit den geringsten Reaktionsgeschwindigkeiten, d. h. also die Schritte, die geschwindigkeitsbestimmend sind.

Die Schrittmacherenzyme der Glykolyse in den Leberzellen sind die Glucokinase, Phosphofructokinase und Pyruvatkinase. Diese Enzyme katalysieren die drei Reaktionen in der Glykolyse, die praktisch irreversibel verlaufen. Sie müssen deshalb bei der Gluconeogenese durch andere Enzyme umgangen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Pyruvatkinase von Interesse (EC 2.7.1.40). Sie katalysiert die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat. Von der Pyruvatkinase existieren bei der Ratte 3 Isoenzyme: Typ M_1 in Muskel und Gehirn; Typ M_2 in Niere, fötalem Gewebe und in geringer Konzentration in der Leber; Typ L in Leber und Niere (1-8). In den Parenchymzellen der Leber ist Typ L, in den Nichtparenchymzellen der Typ M_2 lokalisiert (9,10). Typ M_2 ist charakteristisch für nichtdifferenziertes Gewebe. So ist sein Anteil in rasch wachsenden, wenig differenzierten Lebertumoren besonders hoch (3,11). Das Verhältnis der Isoenzyme L und M_2 zueinander ist ein Indikator für die Differenzierung von Leberzellen.

Die Pyruvatkinase unterliegt in ihrer Aktivität sowohl allosterischen als auch hormonellen Regulationsmechanismen. Die Ernährung hat ebenfalls Einfluß auf die Aktivität. Kohlenhydratreiche Nahrung führt zu einem Ansteigen, proteinreiche Nahrung zu einem Absinken der Aktivität (1,12,13,38). Hannappel (38) konnte zeigen, daß nach dreitägigem Fasten bei der Wiederauffütterung mit Normaldiät (Haltungsdiät 1324 der Firma Altromin) die Aktivität der Pyruvatkinase auf das 2-3fache der Aktivität ungefasteter Ratten ansteigt, proteinreiche Nahrung zu keinem Anstieg im Vergleich zu gefasteten Tieren führt, während Fütterung mit Kohlenhydratdiät zu einem steilen Anstieg der Aktivität der Pyruvatkinase führt (bis zum 6-7fachen der Aktivität bei fastenden Ratten). Es konnte gezeigt werden, daß diese Aktivitätsänderungen auf Änderungen der Enzymmenge in den Leberzellen zurückzuführen sind. Die Aktivitätsänderungen beschränken sich vorwiegend auf das Isoenzym Typ L (1,3,14).

Glucagon oder Adrenalin führen zu einer Inaktivierung der Pyruvatkinase. Diese Wirkung läßt sich durch Insulin aufheben (15,16,17). Insulin allein bewirkt nur eine schwache, kurzfristige Änderung der Aktivität (18). Dieses Hormon ist jedoch Induktor der Pyruvatkinase und erhöht die Syntheserate dieses Enzyms, was sich in einer längerfristigen Aktivitätszunahme durch Vergrößerung der Enzymmenge äußert. Die Aktivitätsabnahme durch Glucagon oder Adrenalin wird vermutlich über eine c-AMP abhängige Phosphorylierung erreicht (17-21). Durch die Phosphorylierung wird die Affinität der Pyruvatkinase zum Phosphoenolpyruvat verringert. Die bei Substratsättigung erreichbare Maximalgeschwindigkeit (v_{max}) ändert sich jedoch nicht (K-Typ-Modifikation) (22).

Eine Aktivierung der Pyruvatkinase bei niedriger Substratkonzentration ist durch Fructose-1,6-bisphosphat (FbP_2) möglich. Erstmals wurde diese allosterische Regulation für die Pyruvatkinase aus Hefe von B. Hess, R. Haeckel und K. Brand beschrieben (23). Auch die Pyruvatkinase aus Leber ist durch Fructose-1,6-bisphosphat aktivierbar (24,25,26). Hemmer der Pyruvatkinase sind ATP, L-Alanin und Acetyl-CoA (27,28,29). In der Leber scheint die Pyruvatkinase auch bei niedrigsten Konzentrationen dieser Hemmer inaktiv zu sein und erst durch Fructose-1,6-bisphosphat aktiviert zu werden (30). Die Aktivität in der Zelle ändert sich dann entsprechend der Fructose-1,6-bisphosphatkonzentration.

Die Wirkungsweise des Insulins ist nicht restlos geklärt. Ein Teil seiner Wirkung beruht auf einer Erhöhung der Permeabilität von Zellmembranen verschiedener Organe und Gewebe. Dieser Effekt tritt innerhalb weniger Minuten auf. Längerfristige Wirkung hat Insulin auf Enzyme des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsels. So wirkt Insulin als Induktor von Schlüsselenzymen der Glykolyse und Glykogensynthese. Phosphofructokinase und Pyruvatkinase werden in ihrer Aktivität gesteigert. Die Wirkung auf den Proteinstoffwechsel besteht in einer vermehrten Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle (Permeabilitätsänderung) und einer Steigerung der Proteinbiosynthese.

Die Ernährung hat großen Einfluß auf die Höhe des Insulinspiegels. Durch Fasten wird der Insulinspiegel im Blut gesenkt (31,32,35). Kohlenhydratreiche Nahrung führt zu einer Verminderung der Insulinkonzentration im Blut der Ratte (33,34,35). Die stärksten Verringerungen von Seruminsulinkonzentrationen konnten nach Fütterung von Ratten mit proteinarmer Diät beobachtet werden (36,37,35). Trump (35) beschäftigte sich unter anderem mit der Frage einer circadianen Rhythmik der Insulinkonzentrationen im Blut der Ratte. Er stellte fest, daß bei mit Normaldiät gefütterten Ratten, und bei einem zeitlichen Abstand der Meßpunkte von 4 Stunden, die höchsten Insulinspiegel um 8⁰⁰ und 24⁰⁰ auftraten (etwa 50 μ U/ml), und um 12⁰⁰ und 4⁰⁰ die niedrigsten (etwa 30 μ U/ml).

2. PROBLEMSTELLUNG UND VERSUCHSPLAN

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Frage, ob die in früheren Versuchen gefundenen hohen bzw. niedrigen Insulinkonzentrationen im Blut der Ratte (35), sowie die Enzymaktivität der Pyruvatkinase in der Leber (38), bei extrem kohlenhydratreicher bzw. proteinreicher Ernährung einer circadianen Rhythmik unterliegen. Außerdem soll geklärt werden, ob die ernährungsbedingten hohen bzw. niedrigen Enzymaktivitäten durch die Rhythmik der Nahrungsaufnahme noch zusätzlich kurzfristig verändert werden. Von Interesse ist weiterhin, ob zwischen den möglichen circadianen Schwankungen der Pyruvatkinaseaktivität und dem Insulinspiegel eine positive Korrelation besteht.

Der Versuchsplan umfaßt folgende Punkte:

1. 24-Stunden-Profil der Pyruvatkinase, wobei die Gesamtaktivität im Lebercytosol gemessen wird ($v_{\max}$ -Messung).
2. 24-Stunden-Profil des Quotienten $v/v_{\max}$ der Pyruvatkinase Typ L. Die Messung erfolgt bei einer genau definierten Substratkonzentration und anschließender Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit in Anwesenheit des Aktivators Fructose-1,6-bisphosphat.
3. 24-Stunden-Profil der Insulinkonzentration im Plasma.
4. 24-Stunden-Profil der Proteinmenge pro Leber.
5. 24-Stunden-Profil der Magen- und Lebergewichte.

Es werden für alle Profile sowohl kohlenhydratreich als auch proteinreich ernährte Ratten untersucht. Die Futterzugabe erfolgt während der 24 Stunden nicht ad libitum, sondern zu einer genau festgelegten Zeit, um Schwankungen der Meßergebnisse durch unterschiedliche individuelle Freßzeiten der Ratten auszuschalten.

3. MATERIAL

3.1. Versuchstiere

Für alle Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden männliche Sprague Dawley Ratten verwendet, die wir von der Firma Grassner aus Sulzfeld bezogen. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere 8 Tage in unserem Tierstall gehalten (Haltungsdiät 1324). Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Ratten 72 Tage alt. Die Tierhaltung erfolgte in Makrolon-Käfigen Typ 3 ($27 \times 42 \times 15 \text{ cm}^3$) und Typ 4 ($38,5 \times 59 \times 20 \text{ cm}^3$) der Firma Ehret, wobei 3 bzw. 6 Ratten in einem Käfig auf Sägemehl untergebracht waren. Wasser stand aus Saugflaschen zur freien Verfügung. Die Futterzugabe erfolgte nach einem besonderen Fütterungsschema, das später noch erläutert wird. Ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Zyklus mit Dunkelphase von 18⁰⁰ bis 6⁰⁰ wurde konsequent eingehalten. Die Temperatur im Tierstall betrug 20-25°C.

3.2. Diäten

Zur Anwendung kamen nur Diäten der Firma Altromin:

Haltungsdiät 1324

Proteindiät C 1009 (minimaler Kohlenhydrat- und Fettgehalt)

Kohlenhydratdiät C 1005 (minimaler Protein- und Fettgehalt)

Diät	Protein	Fett	Kohlenhydrate
Haltungsdiät (1324)	25,5%	5,6%	68,9%
Proteindiät (C 1009)	88,5%	6,1%	5,4%
Kohlenhydrat- diät (C 1005)	0,5%	0,1%	99,4%

Tab. 1:

Zusammensetzung der Altromin-Diäten (39).

3.3. Fütterungsschema

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere bei uns 8 Tage mit der Haltungsdiät gefüttert (ad libitum). Anschließend wurde eine Fastenperiode von 3 Tagen eingeschaltet, während der die Tiere nur Wasser bekamen. Nach dem Fasten bekam die eine Hälfte der hatten Proteindiät, die andere Hälfte Kohlenhydratdiät, jeweils für 52 Stunden (ad libitum). Am Versuchstag wurde das Futter um 12⁰⁰ entzogen und dann von 20¹⁵ bis 1¹⁵ die entsprechenden Diäten wieder zugegeben.

3.4. Geräte

Homogenisator nach Potter und Elvehjem: Heidolph 50113

Ultrazentrifuge: Beckman L3-50; Rotor SW 27
Zentrifuge: Heraeus Christ Junior
Photometer: Zeiss PM 4
Potentiometerschreiber: Servogor S (Goerz Electro)
Counter: Beckman Biogamma

3.5. Chemikalien

Die Chemikalien wurden von der Firma Merck, die Enzyme und Biochemikalien von der Firma Boehringer bezogen. Bei der Insulinbestimmung wurde der Radioimmun-Assay-Kit Insik-3 der Firma Isotopendienst West, Dreieich, verwandt.

4. M E T H O D E N

4.1. Zeitlicher Ablauf und Aufteilung der Versuchstiere

Um die Reproduzierbarkeit der Untersuchungen zu überprüfen und mögliche systematische Fehler auszuschalten, wurden im Abstand von 6 Wochen 2 Versuchsreihen unter völlig identischen Bedingungen mit jeweils 102 Ratten durchgeführt. Da die Meßergebnisse bei beiden Serien weitgehend Übereinstimmung zeigten, konnten die Werte der Versuchsreihen zusammengefaßt werden.

Das Gewicht der Ratten wurde an 3 Zeitpunkten bestimmt:

- zu Beginn der dreitägigen Fastenperiode
- am Ende des Fastens, unmittelbar vor dem Wiederauf-
füttern mit den Diäten
- unmittelbar vor der Tötung

Am Versuchstag wurden ab 18⁰⁰ alle 2 Stunden bis zum nächsten Tag 18⁰⁰ je 3 kohlenhydratreich ernährte und 3 proteinreich ernährte Ratten getötet, Blut- und Leberproben entnommen, sowie das Magengewicht bestimmt. Die restlichen 24 Ratten einer Versuchsreihe wurden am folgenden Tag um 19⁰⁰, 21⁰⁰, 23⁰⁰ und 1⁰⁰ getötet, damit für die entscheidende Zeit der Futterzugabe von 20¹⁵ bis 1¹⁵ stündliche Meßergebnisse vorlagen. Das Fütterungsschema wurde für diese 24 Ratten so verschoben, daß zum Schlachttermin für alle Ratten gleiche Bedingungen vorlagen.

4.2. Gewinnung der Proben

Die Ratten wurden mit Äther narkotisiert. Blut wurde aus den Schwanzgefäßen gewonnen, mit Trasylol (+ EDTA-Zusatz) ungerinnbar gemacht und anschließend bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde zur Insulinbestimmung verwendet. Bis zum Zeitpunkt der Messung wurde das Plasma bei - 25°C eingefroren.

Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde mittels einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Spezialzange eine Leberprobe in situ entnommen. Diese wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei - 70°C aufbewahrt. Diese Probe wurde von einem anderen Doktoranden zur cyclo-AMP-Bestimmung verwendet.

Der Rest der Leber wurde entnommen, gewogen und unter Eiskühlung im 4fachen Volumen an Homogenisationspuffer (Zusammensetzung: 10 mM TRA-HCl-Puffer, 10 mM EDTA-Na₂, 50 mM NaF; pH=7,5) mit einem Teflon-Homogenisator nach Potter und Elvehjem homogenisiert. Zur Gewinnung des Cytosols wurde das Homogenat bei 4°C 60 Minuten lang in der präparativen Ultrazentrifuge L3-50 der Firma Beckman , bei 105000 bis 130000 x g, zentrifugiert. Aus dem Cytosol wurde die Aktivität der Pyruvatkinase und der Proteingehalt pro Gramm Leber bestimmt.

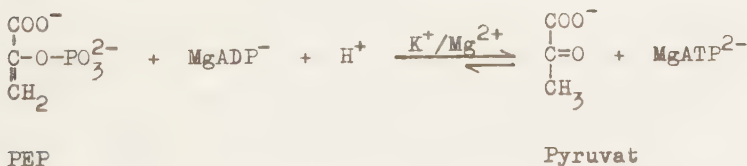
4.3. Trennung der Pyruvatkinase Typ L von Typ M₂

Für die $v/v_{\max}$ -Messung wurden 0,5 ml des Cytosols besonders behandelt. Um die Trennung der Pyruvatkinase Typ L vom Typ M₂ zu erreichen, wurde nach Passeron, Asúa und Carminatti (40) eine Ammonsulfatfällung zwischen 20-40% Sättigung durchgeführt. Der Niederschlag wurde bei 4°C und 3000 U/min abzentrifugiert, und, nachdem der Überstand verworfen worden war, in 0,15 ml TRA-Puffer (proteinreich ernährte Ratten) bzw. 0,5 ml TRA-Puffer (kohlenhydratreich ernährte Ratten) aufgelöst.

4.4. Enzymaktivitätsmessungen

Alle Enzymtests wurden bei 25°C durchgeführt. Der Extinktionskoeffizient für NADH beträgt bei 340 nm $6,22 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Gemessen wurde im Spektralphotometer Zeiss PM 4 in Halbmikro-Küvetten (d=1 cm).

4.4.1. Pyruvatkinase



4.4.1.1. $v_{\max}$ -Messung

Für die Messung der Aktivität der Pyruvatkinase wurde eine Methode angewandt, die von Kupfer (41) nach der Vorschrift von Bücher und Pfeleiderer (42) modifiziert wurde. Dieser Test war ursprünglich für Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel ausgearbeitet worden. Der $K_{0,5}$ -Wert der Pyruvatkinase aus Rattenleber beträgt etwa 2 mM.

Testansatz:

		Konzentration im Test
0,1 M TRA·HCl pH=7,6	0,8325 ml	78 mM
0,1 M MgSO ₄ }	0,1000 ml	9,4 mM
0,5 M KCl }		47 mM
10 mM NADH	0,0150 ml	0,14 mM
0,1 M PEP	0,0500 ml	4,7 mM
3,2 M LDH 500 U/mg	0,0025 ml	7,5 mM
Probe: Kohlenhydratdiät	0,0050 ml	
Proteindiät	0,0150 ml	
Start:		
0,1 M ADP	0,0500 ml	4,7 mM

Die Messung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit erlaubt nur eine Aussage über die Gesamtaktivität des Enzyms im Cytosol. Ob eine kurzfristige Änderung der Affinität der Pyruvatkinase zu ihrem Substrat Phosphoenolpyruvat erfolgte, also der $K_{0,5}$ -Wert des Enzyms sich veränderte, ist damit nicht festzustellen. Diese Aussage erlaubt erst die $v/v_{\max}$ -Messung.

4.4.1.2. $v/v_{\max}$ -Messung

Die $v/v_{\max}$ -Messung erfolgte nach der von E. Hannappel ausgearbeiteten Methode. Für diese Messung wurde nur der Anteil an Pyruvatkinase Typ L im Cytosol herangezogen. Die Trennung von Typ L und Typ M_2 erfolgte durch eine Ammonsulfatfällung (siehe S. 11). Die Reaktionsgeschwindigkeit v wurde für jede Probe bei einer genau eingehaltenen Phosphoenolpyruvatkonzentration von 2,05 mM gemessen. Durch Nachstarten der Reaktion mit Fructose-1,6-bisphosphat (Aktivator der Pyruvatkinase) erreichte man die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}$. Eine Änderung des Quotienten $v/v_{\max}$ zu höheren Zahlenwerten bedeutet eine Verschiebung des $K_{0,5}$ -Wertes zu kleineren Konzentrationen, eine Verkleinerung des Quotienten bedeutet eine Verschiebung des $K_{0,5}$ -Wertes zu höheren Substratkonzentrationen. Wird der $K_{0,5}$ -Wert kleiner, ist das gleichbedeutend mit einer Affinitätszunahme zwischen Enzym und Substrat. Das bedeutet, daß schon mit niedrigen Substratkonzentrationen höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht werden. In der Zelle bedingt das eine höhere Umsatzrate des Substrats.

Die Abbildung 1 verdeutlicht das Prinzip dieser Messung. Die Aktivität eines allosterischen Enzyms wird als Funktion der Substratkonzentration dargestellt, wobei auf der Ordinate die Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen wird. Kurve a ist in unserem Fall die Pyruvatkinase Typ L in Anwesenheit des Aktivators Fructose-1,6-bisphosphat. Kurve c zeigt die sigmoidale Kinetik des Enzyms im unbeeinflussten Zustand. Bei Kurve b wurde

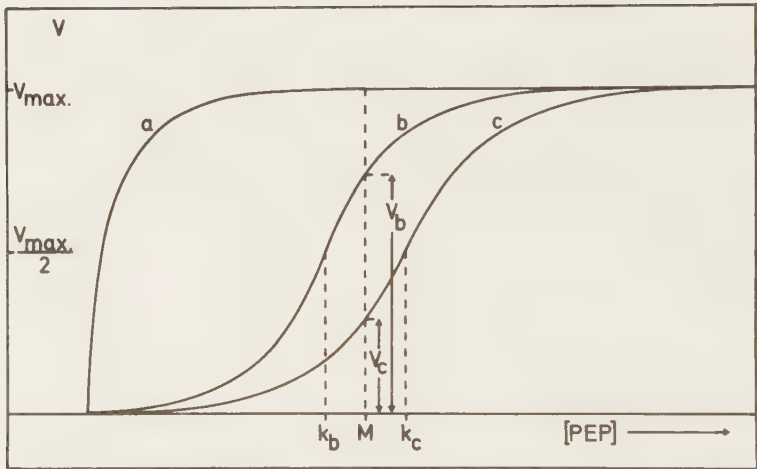


Abb. 1:

Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei verschiedenen Regulationszuständen eines allosterischen Enzyms.

durch einen Regulationsvorgang die Affinität des Enzyms zum Substrat vergrößert. M ist der Meßpunkt; in unserem Fall $2,05 \text{ mM}$. K_b und K_c sind die jeweiligen $K_{0,5}$ -Werte des Enzyms. Der Quotient $v_b/v_{max.}$ ist deutlich größer als $v_c/v_{max.}$. Der zugehörige Wert K_b ist im Vergleich zu K_c nach links, zu niedrigeren Substratkonzentrationen verschoben. Es wird deutlich, daß der Quotient $v/v_{max.}$ einen Indikator für eine Affinitätsänderung des Enzyms darstellt.

Testansatz:

		Konzentration im Test
0,1 M TRA·HCl pH=7,6	0,7825 ml	73 mM
0,1 M MgSO ₄ }	0,1000 ml	9,4 mM
0,5 M KCl }		47 mM
10 mM NADH	0,0150 ml	0,14 mM
21,8 mM PEP	0,1000 ml	2,05 mM
3,2 M LDH 500 U/mg	0,0025 ml	7,5 mM
Probe:	0,0150 ml	
Start:		
0,1 M ADP	0,0500 ml	4,7 mM
Nachstart:		
10 mM FbP ₂	0,0100 ml	0,09 mM

4.5. Insulinbestimmung

Die Bestimmung der Insulinkonzentration im Plasma erfolgte radioimmunologisch, nach der von Yalow und Berson (43) beschriebenen Methode. Zur Verwendung kam der Radioimmun-Assay-Kit Insik-3 der Firma Isotopen-dienst West, Dreieich, und Ratteninsulin als Standard.

Ein Aliquot von 0,1 ml Plasma wurde mit 0,1 ml Insulin-antiserum und 0,1 ml J-125-markiertem Insulin 24 Stunden lang bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde zur Entfernung des nicht antikörpergebundenen Insulins 1 ml

Kohlesuspension (Aktivkohlepulver suspendiert in Phosphatpuffer pH=7,4) zugesetzt und bei 3000 U/min zentrifugiert. In 0,75 ml des Überstands wurde, mit dem Biogamma der Firma Beckman, die Radioaktivität bestimmt. Die Insulinkonzentration wurde anhand einer mitgeführten Standardreihe aus der exponentiellen Eichkurve bestimmt.

4.6. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde aus dem Cytosol mittels der Biuret-Methode bestimmt.

0,5 ml Wasser, 0,2 ml 3 M Trichloressigsäure und 50 μ l (Cytosol proteinreich ernährter Ratten) bzw. 75 μ l (Cytosol kohlenhydratreich ernährter Ratten) Probe wurden in einem 2 ml fassenden Plastikzentrifugenglas gemischt. Nach 30 Minuten wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 1 ml Biuret-Reagens (44) gelöst und nach 10 Minuten wurde die Extinktion, im Spektralphotometer Zeiss PM 4, bei 546 nm gegen den Leerwert gemessen. (Extinktionskoeffizient: 0,277 cm^2/mg)

4.7. Statistik

Alle Einzelwerte wurden aus Zweifachmessungen gemittelt. Streuungen von bis zu 10% wurden zugelassen. Aus jeweils 6 Einzelwerten pro Meßzeitpunkt wurde der Mittelwert gebildet. Die Streuung der Einzelwerte wird durch den SEM-Wert (Standardabweichung des arithmetischen Mittels) ausgedrückt.

5. E R G E B N I S S E

5.1. Kontrolle des zeitlichen Verlaufs der Nahrungs- aufnahme

Um einen Überblick über die Nahrungsaufnahme zu erhalten, bestimmen wir 3 Parameter: Körpergewicht, Magengewicht und Lebergewicht. Das Körpergewicht dokumentiert den Ernährungszustand vor und während der Fastenperiode und nach dem Wiederauffüttern mit den Diäten. Falls eines oder mehrere Tiere in ihren Körpergewichtsänderungen stark vom Durchschnitt abweichen, kann man dies bei der Auswertung der Meßergebnisse berücksichtigen. Die Magen- und Lebergewichte sind Parameter, die das Freßverhalten während der 24-stündigen Versuchsdauer dokumentieren.

5.1.1. Körpergewicht

Das Körpergewicht wird zu 3 Zeitpunkten bestimmt: zu Beginn des Fastens, nach dem Fasten und nach dem Wiederauffüttern. Zu Beginn des Fastens, nachdem sie 8 Tage in unserem Tierstall mit Normaldiät gerüttelt worden sind, haben die Ratten ein Durchschnittsgewicht von 292 ± 20 g. Nach der 3-tägigen Fastenzeit sinkt das Durchschnittsgewicht um 50 g auf 242 ± 18 g. Beim Wiederauffüttern mit Proteindiät erreicht die eine Hälfte der Ratten zum Schlachtermin ein Gewicht von 263 ± 20 g, also eine Zunahme um 21 g. Bei den mit

Kohlenhydratdiät aufgefütterten Ratten dagegen, zeigt sich eine weitaus geringere Gewichtszunahme. Deren Durchschnittsgewicht erhöht sich nur um 3 g auf 245 ± 20 g.

5.1.2. Magengewicht

Die Magengewichte (Abb. 2), deren Durchschnittswert um 20^{00} bei den proteinreich ernährten 4 g und bei den kohlenhydratreich ernährten Ratten 3 g beträgt, nehmen mit Beginn der Futterzugabe um 20^{15} stark zu, bis sie um 23^{00} einen Maximalwert von etwa 16 g erreichen. Dieser Verlauf ist bei beiden Diäten in etwa identisch. Obwohl Futter bis 1^{15} zur Verfügung steht, ist ab 23^{00} ein Abfall der Magengewichte zu beobachten. Bei der Kohlenhydratdiät nehmen die Gewichte bis 2^{00} stärker ab als bei der Proteindiät. Ab 2^{00} fallen die Kurven bei beiden Diäten in etwa gleich stark ab, wobei die Werte bei der Kohlenhydratdiät 1 bis 2 g niedriger liegen. Erst um 12^{00} wird der Ausgangszustand wieder erreicht.

5.1.3. Lebergewicht

Die durchschnittlichen Lebergewichte (Abb. 2) betragen zu Beginn der Futterzugabe bei den proteinreich ernährten Ratten 11,6 g, bei den kohlenhydratreich ernährten Ratten 10,3 g. Während der Fütterungszeit steigen die Durchschnittsgewichte bei der Proteindiät langsam an, bis um 6^{00} ein Maximum von 13 g erreicht wird.

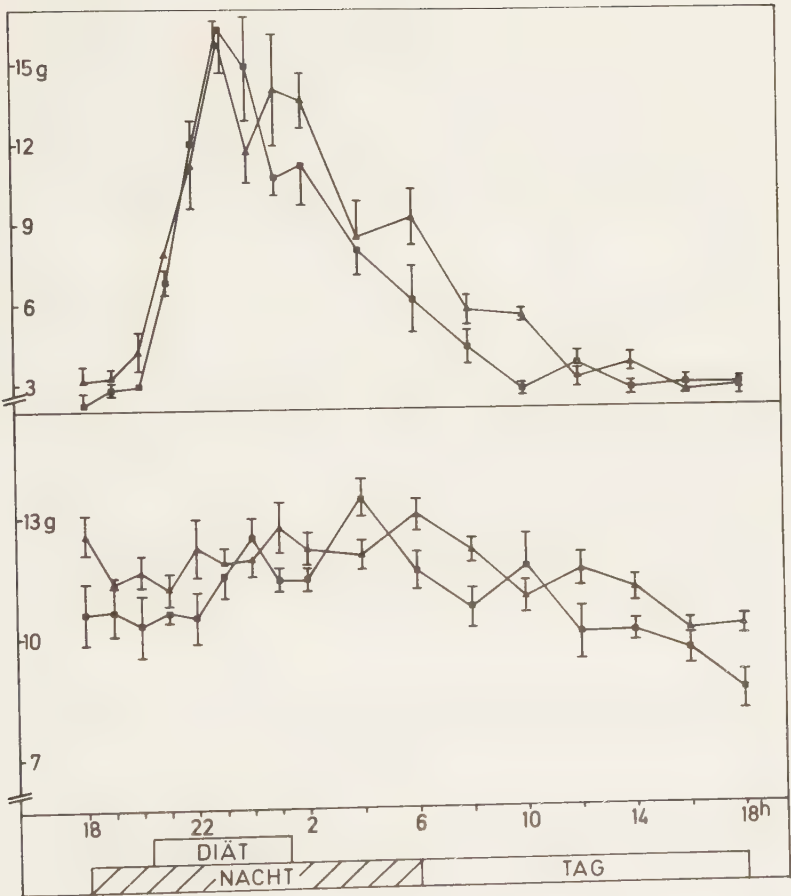


Abb. 2:

Oben: 24-Stunden-Profil der Magengewichte

Unten: 24-Stunden-Profil der Lebergewichte

▲ = proteinreiche Diät, ■ = kohlenhydratreiche Diät

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (6 Tiere), wenn SEM nicht eingezeichnet ist, liegt sie innerhalb der Zeichen.

Danach erfolgt ein Gewichtsabfall unter die Ausgangssituation (10,1 g). Bei den kohlenhydratreich ernährten Ratten ist ein Anstieg der Lebergewichte bis zu einem Maximum um 4⁰⁰ festzustellen (13,4 g). Bis 18⁰⁰ nimmt dann das Durchschnittsgewicht bis auf 8,5 g ab, was deutlich unter dem Ausgangsgewicht liegt.

5.2. 24-Stunden-Profil der Aktivität der Pyruvatkinase

Die Aktivität der Pyruvatkinase wird sowohl in U (Units) pro g Leber, als auch in U pro Gesamtleber angegeben. Bei Bezug auf Gesamtleber werden die Konzentrationsschwankungen des Enzyms, die durch Veränderungen des Lebergewichtes entstehen, ausgeschaltet. Man kann weiterhin die spezifische Aktivität der Pyruvatkinase angeben, indem man die Aktivität auf mg Protein bezieht.

5.2.1. Bezug der Aktivität auf g Leber und Gesamtleber

Bei der Auftragung U pro g Leber (Abb. 3) sind bei den proteinreich ernährten Ratten keine Aktivitätsänderungen festzustellen. Die Kurve liegt konstant bei einem Wert von etwa 25 U pro g Leber. Bei der Kohlenhydratdiät liegt der Ausgangswert um 20⁰⁰ bei 73 U pro g Leber. Ab 4⁰⁰ ist ein Ansteigen der Aktivität zu beobachten, wobei um 18⁰⁰ der Maximalwert von 103 U pro g Leber erreicht wird.

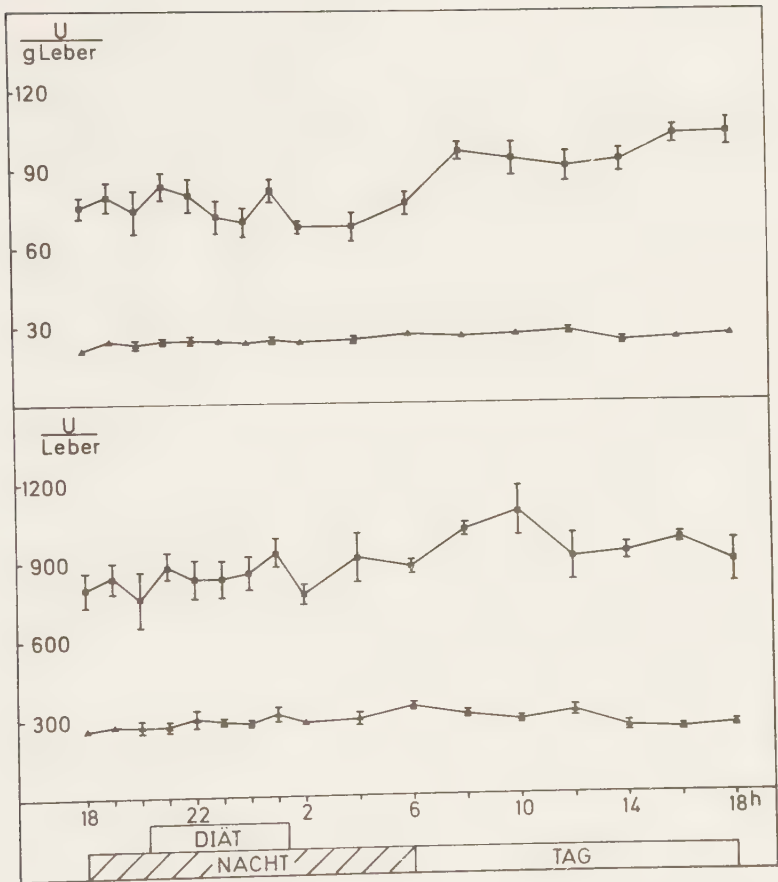


Abb. 3:

Oben: 24-Stunden-Profil der Aktivität der Pyruvatkinase bezogen auf g Leber

Unten: 24-Stunden-Profil der Aktivität der Pyruvatkinase bezogen auf Gesamtleber

▲ = proteinreiche Diät, ■ = kohlenhydratreiche Diät
 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (6 Tiere), wenn SEM nicht eingezeichnet ist, liegt es innerhalb der Zeichen.

Bei der Auftragung U pro Gesamtleber kann man bei den proteinreich ernährten Ratten ebenfalls keine Aktivitätsänderungen feststellen (Abb. 3). Die Werte schwanken nur ganz leicht um 300 U pro Gesamtleber. Bei der Kohlenhydratdiät beträgt um 20⁰⁰ die Aktivität 760 U pro Leber. Ab 2⁰⁰ ist ein leichter Anstieg zu beobachten, wobei um 10⁰⁰ der höchste Wert mit etwa 1080 U erreicht wird. Danach fällt die Aktivität bis auf etwa 890 U um 18⁰⁰ ab.

5.2.2. Bezug der Aktivität auf mg Protein

Die Gesamtmenge an löslichem Protein pro Leber ist bei Proteindiät um 40-50% größer als bei Kohlenhydratdiät (Abb. 4). Bei den proteinreich ernährten Ratten sinkt die Proteinmenge von 18⁰⁰ bis um 20⁰⁰ auf etwa 1120 mg ab. Ab 20⁰⁰ zeigt sich ein Anstieg, der bis um 6⁰⁰ anhält. Der um diese Zeit gemessene höchste Durchschnittswert beträgt 1350 mg. Danach verringert sich die Proteinmenge wieder, um schließlich um 16⁰⁰ wieder den Ausgangswert von 20⁰⁰ zu erreichen. Bei Kohlenhydratdiät liegt der Anfangswert um 18⁰⁰ bei 800 mg Protein pro Leber. Ab 2⁰⁰ erfolgt ein leichter Anstieg. Das Maximum wird um 14⁰⁰ mit etwa 900 mg erreicht. Bis um 18⁰⁰ sinkt die Proteinmenge fast bis auf das Ausgangsniveau ab.

Die spezifische Aktivität der Pyruvatkinase (Abb. 4) zeigt bei den mit Proteindiät gefütterten Ratten keine Änderungen. Die Kurve liegt konstant bei knapp über 0,2 U pro mg löslichem Protein. Bei der Kohlen-

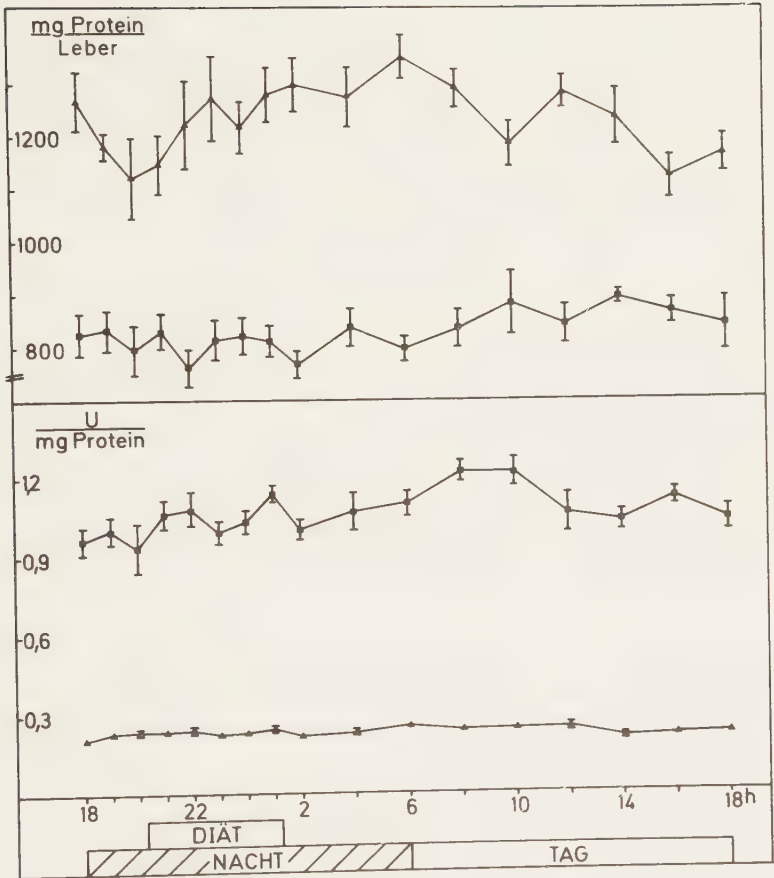


Abb. 4:

Oben: 24-Stunden-Profil der Menge an löslichem Protein pro Leber

Unten: 24-Stunden-Profil der Aktivität der Pyruvatkinase bezogen auf mg lösliches Protein

▲ = proteinreiche Diät, ■ = kohlenhydrateiche Diät
 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (6 Tiere), wenn SEM nicht eingezeichnet ist, liegt sie innerhalb der Zeichen.

hydratdiät beträgt die Aktivität pro mg Protein das 4-5fache. Ab 20⁰⁰ (0,93 U pro mg) zeigt sich ein leichter Anstieg, der um 8⁰⁰ und 10⁰⁰ die Höchstwerte von 1,2 U pro mg Protein erreicht. Bis 18⁰⁰ fällt die spezifische Aktivität dann wieder etwas ab, bleibt aber knapp über dem Ausgangsniveau.

5.3. Circadianes Verhalten der Substratkinetik der Pyruvatkinase Typ I

Bei dieser Messung wird die Affinität der Pyruvatkinase zu ihrem Substrat Phosphoenolpyruvat durch den Quotienten $v/v_{\max}$ zum Ausdruck gebracht. Wie in Abschnitt 4.4.1.2. erläutert, erlauben Änderungen dieses Quotienten direkte Rückschlüsse auf Affinitätsänderungen des Enzyms.

Für die Meßpunkte um 19⁰⁰, 21⁰⁰, 23⁰⁰, 1⁰⁰ und den 18⁰⁰-Wert am Ende des 24-Stunden-Profils wurden nur die Meßwerte der 3 Ratten der ersten Versuchsreihe verwendet.

Bei den proteinreich ernährten Ratten liegen die $v/v_{\max}$ -Werte, außer während der Zeit der Fütterung, um ca. 20% über den Werten der kohlenhydratreich ernährten Ratten (Abb. 5). Die Kurve zeigt keine großen Schwankungen und verläuft ohne starke Anstiege oder Abfälle. Die Werte liegen etwa bei 0,3. Der höchste Wert von 0,32 ist um 23⁰⁰ festzustellen.

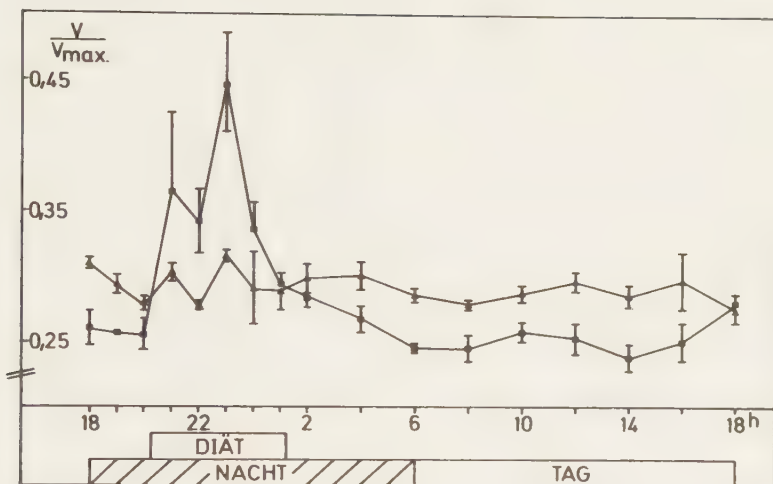


Abb. 5:

24-Stunden-Profil des Quotienten v/v_{max} der Pyruvatkinase Typ L.

▲ = proteinreiche Diät, ■ = kohlenhydratreiche Diät

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (6 Tiere), wenn SEM nicht eingezeichnet ist, liegt sie innerhalb der Zeichen.

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (3 Tiere) zu den Zeiten 19⁰⁰, 21⁰⁰, 23⁰⁰, 1⁰⁰ und 18⁰⁰.

Bei der Kohlenhydratdiät beträgt der Ausgangswert um 20⁰⁰ etwa 0,25. Er liegt deutlich unter dem Wert bei Proteindiät. Nach Beginn der Fütterung um 20¹⁵ ist ein steiler Anstieg zu beobachten. Um 21⁰⁰ beträgt das Verhältnis v/v_{max} etwa 0,37. Nach einem kleinen Abfall um 22⁰⁰, wird um 23⁰⁰ der Maximalwert 0,45 erreicht. Dieser Wert liegt um 80% höher als der Ausgangswert. Es folgt ein steiles Absinken bis um 1⁰⁰, danach ein flacher Abfall, der bis um 6⁰⁰ anhält. Um diese Zeit wird das Ausgangsniveau wieder erreicht. Bis 16⁰⁰ treten keine großen Schwankungen mehr auf. Von 16⁰⁰ bis 18⁰⁰ nimmt der Wert des Quotienten v/v_{max} nochmals etwas zu.

5.4. Circadianes Verhalten des Plasmainsulinspiegels

Das circadiane Verhalten des Plasmainsulinspiegels ist in Abb. 6 dargestellt. Die Insulinkonzentration ist in μU pro ml Plasma angegeben. Auffallend ist, daß der Insulinspiegel bei der Proteindiät durchwegs höher ist als bei der Kohlenhydratdiät, und zwar um das 2-3fache. Zu erwähnen ist noch, daß der $20^{\circ\circ}$ -Wert bei den proteinreich ernährten Ratten nur aus den 3 Tieren der zweiten Versuchsreihe bestimmt werden konnte.

Bei der Proteindiät zeigt sich von $18^{\circ\circ}$ bis $20^{\circ\circ}$ ein Konzentrationsabfall von $25 \mu\text{U}$ bis auf $10 \mu\text{U}$ pro ml Plasma. Ab $20^{\circ\circ}$ erfolgt ein sehr rascher Anstieg der Konzentration, bis um $22^{\circ\circ}$ der Höchstwert von $87 \mu\text{U}$ pro ml erreicht wird. Dieser Wert ist etwa 8-9 mal so groß wie der Ausgangswert. Es folgt ein ebenso plötzlicher Abfall. Um $23^{\circ\circ}$ beträgt die Konzentration nur noch $37 \mu\text{U}$ pro ml, um dann langsam weiter abzusinken, bis um $4^{\circ\circ}$ mit $14 \mu\text{U}$ fast das Ausgangsniveau wieder erreicht wird. Der Plasmainsulinspiegel hält sich dann, bis auf einen Einbruch um $10^{\circ\circ}$ ($7 \mu\text{U}$ pro ml Plasma), in etwa auf diesem Niveau.

Bei den kohlenhydratreich ernährten Ratten liegt der Wert um $20^{\circ\circ}$ bei $6 \mu\text{U}$ pro ml Plasma. Ab $20^{\circ\circ}$ erfolgt ein Anstieg der Konzentration, der jedoch lange nicht so stark ist, wie bei der Proteinfütterung. Der höchste Wert wird um $23^{\circ\circ}$ mit $31 \mu\text{U}$ pro ml erreicht. Das ist etwa 4 mal so hoch wie der $20^{\circ\circ}$ -Wert. Danach erfolgt ein relativ langsames Absinken des Plasmainsulinspiegels, bis um $6^{\circ\circ}$ das Ausgangsniveau wieder erreicht wird. Im weiteren Verlauf bleibt die Insulinkonzentration in etwa auf diesem Niveau.

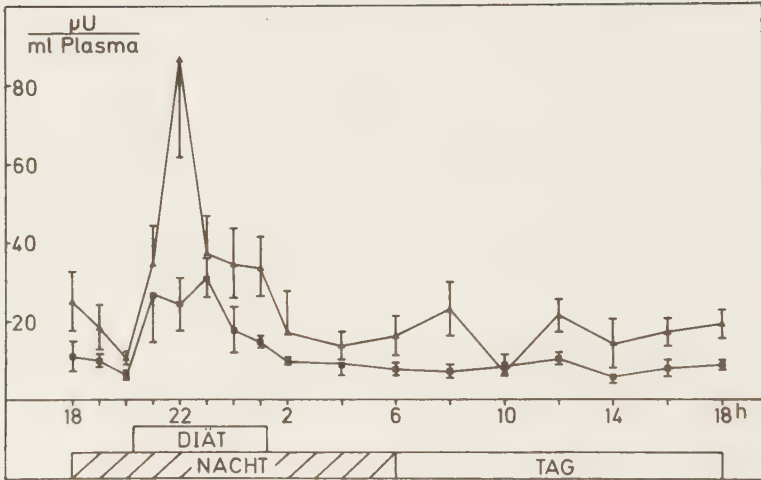


Abb. 6:

24-Stunden-Profil des Plasmainsulinspiegels bezogen auf ml Plasma.

▲ = proteinreiche Diät, ■ = kohlenhydratreiche Diät
 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (6 Tiere), wenn SEM nicht eingezeichnet ist, liegt sie innerhalb der Zeichen.

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ (3 Tiere) um 20⁰⁰ bei der Proteindiät.

6. DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war, das circadiane Verhalten der Pyruvatkinase und des Insulins, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme, zu untersuchen. Durch eine extrem kohlenhydratreiche bzw. proteinreiche Ernährung der Ratten wurde eine glykolytische bzw. gluconeogenetische Stoffwechsellaage geschaffen. Das besondere Interesse galt der Frage, ob die Pyruvatkinase aus Rattenleber, neben ihren längerfristigen, ernährungsbedingten Aktivitätsänderungen, die, wie Hannappel (38) zeigen konnte, auf Änderungen der Enzymmenge beruhen, auch noch zusätzlichen, kurzfristigen Regulationsmechanismen unterliegt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob, unter den gegebenen Versuchsbedingungen, eine positive Korrelation zwischen Plasmainsulinspiegel und Pyruvatkinaseaktivität besteht. Um diese Probleme zu bearbeiten wurden 24-Stunden-Profile der Pyruvatkinase aus Rattenleber und des Plasmainsulinspiegels von Ratten erstellt, die durch 52-stündige Fütterung mit Streßdiäten in eine glykolytische bzw. gluconeogenetische Stoffwechsellaage gebracht wurden.

In der Literatur gibt es einige Untersuchungen, die sich mit der Frage circadianer Schwankungen von Enzymen und Hormonen befassen. So untersuchten P.A. Edwards und R.G. Gould (45) die circadiane Rhythmik der β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA-Reduktase. Sie verwendeten bei ihren Untersuchungen männliche Sprague Dawley Ratten, die in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten wurden. Gemessen wurde alle zwei Stunden. Es konnten circadiane Schwankungen der

Enzymaktivität bis zu 5-8fach höheren Werten als das Basisniveau festgestellt werden. K. Nagai et al. (46) untersuchten die circadiane Rhythmik der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Schlüsselenzym der Gluconeogenese) in Rattenlebern. Das Enzym zeigte maximale Aktivität am Abend und minimale Aktivität am Morgen und eine deutliche Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme. K. Nagai et al. (47) stellten bei der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase in der Rattenniere ebenfalls circadiane Schwankungen fest. Trump (35) beobachtete bei mit Normaldiät gefütterten Ratten circadiane Schwankungen des Plasmainsulinspiegels. Maximalwerte traten um 8⁰⁰ und 24⁰⁰, Minimalwerte um 12⁰⁰ und 4⁰⁰ auf. Die Messungen erfolgten in 4-stündigen Abständen.

Bevor nun unsere Ergebnisse bezüglich des circadianen Verhaltens der Pyruvatkinase und des Plasmainsulinspiegels diskutiert werden, sollen die Parameter erörtert werden, die bei dieser Arbeit den zeitlichen Verlauf der Nahrungsaufnahme dokumentieren, nämlich Körpergewicht, Magengewicht und Lebergewicht.

Bei den Körpergewichten fällt auf, daß, nach der Gewichtsabnahme um ungefähr 17% während der 3-tägigen Fastenperiode, Unterschiede in der Gewichtszunahme nach Wiederauffütterung auftreten. Während die mit Proteindiät ernährten Ratten um etwa 9% an Gewicht zunehmen, haben die kohlenhydratreich gefütterten Tiere nur eine Zunahme um durchschnittlich 1,2% aufzuweisen.

Diese minimale Gewichtszunahme ist wahrscheinlich durch die fehlende Eiweißzufuhr bei Kohlenhydratdiät bedingt. Die Stickstoffausscheidung (absolutes Stickstoffminimum) geht weiter. Dadurch kommt es offensichtlich zu einem Abbau des Proteinbestandes der Ratte. Dieser Gewichtsverlust wird durch den Aufbau von Glykogen- und Fettreserven aus den zugeführten Kohlenhydraten nur knapp ausgeglichen.

Die Magengewichte dokumentieren das Freßverhalten der Ratten während des Versuches. Unmittelbar nach Beginn der Fütterung nehmen die Magengewichte rasch zu und erreichen um 23⁰⁰ das 4-5fache des Ausgangswerts. Die gleich hohen Maximalgewichte zeigen, daß die Tiere beide Diäten gleich gut annehmen. Dies ist von Bedeutung, weil eine Bevorzugung der einen oder der anderen Diät die Ergebnisse verfälschen würde. Die Magengewichte lassen jedoch nur eine eindeutige Aussage über die Freßzeiten zu, nicht aber über die absoluten Mengen an aufgenommenen Kohlenhydraten bzw. Protein, da die aufgenommene Wassermenge und das Eigengewicht des Magens nicht berücksichtigt werden konnten. Ab 23⁰⁰ werden die Magengewichte wieder kleiner, obwohl Futter bis 1¹⁵ zur Verfügung steht. Dieser Umstand beweist, daß die Diäten den Tieren nicht aufgezwungen wurden, sondern, daß sie nach ihrem Bedarf soviel Nahrung aufnehmen konnten wie sie wollten, und dann ab 23⁰⁰ von selbst die Nahrungsaufnahme einstellten. Die Futterzugabe wurde bewußt in diesen Zeitraum gelegt, in dem die Ratten erfahrungsgemäß bevorzugt fressen.

Bei den Lebergewichten zeigt sich mit Beginn der Fütterungszeit bei beiden Diäten eine Zunahme. Bei der

Proteindiät ist der Anstieg bis zum Maximalwert relativ gering. Bei der Kohlenhydratdiät wird der Maximalwert, der etwa 20% höher liegt als der Ausgangswert, schon 2 Stunden vor dem der Proteindiät erreicht. Diese Gewichtszunahmen sind durch die Synthese und Speicherung von Glykogen in der Leber zu erklären. Bei der Zufuhr reiner Kohlenhydrate wird Glykogen natürlich in größeren Mengen und rascher gebildet, als bei einer Proteindiät, bei der der Glykogenaufbau über den Umweg der Gluconeogenese ablaufen muß. Die ab 4⁰⁰ bzw. 6⁰⁰ einsetzende Abnahme der Lebergewichte, durch Abbau des vorher gespeicherten Glykogens in der Nahrungskarenz, ist bei den kohlenhydratreich ernährten Tieren wesentlich größer (Abnahme um mehr als ein Drittel des Maximalgewichtes von 4⁰⁰), da hier der Glykogenanteil am Gesamtlebergewicht bedeutend größer ist, als bei Proteindiät.

Das Kernproblem dieser Arbeit war das circadiane Verhalten der Pyruvatkinaseaktivität. Die hier gefundenen Werte stimmen gut mit den von Hannappel (38) gemachten Beobachtungen überein. Nur bei der Messung der Aktivität der Pyruvatkinase pro Gesamtleber bei kohlenhydratreich ernährten Ratten liegen seine gefundenen Werte etwas niedriger. Bei den spezifischen Aktivitäten zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung. Wie schon Hannappel feststellen konnte, ist die Aktivität der Pyruvatkinase bei Kohlenhydratdiät sehr viel größer als bei Proteindiät. Diese Tatsache wird in der Literatur von mehreren anderen Autoren ebenfalls bestätigt (1,12,13). Bei unseren Untersuchungen liegt die Pyruvatkinaseaktivität bei Kohlenhydratdiät etwa 3 bis

4 mal höher als bei Proteindiät. Die Aktivität in den Lebern proteinreich ernährter Ratten zeigt keinerlei circadiane Schwankungen, sowohl in der Auftragung U pro g Leber als auch U pro Gesamtleber. Die Pyruvatkinase, ein Schrittmacherenzym der Glykolyse, wird also durch Aufnahme von Nahrungsprotein (Schaffung einer gluconeogenetischen Stoffwechsellage) in ihrer Aktivität kurzfristig nicht beeinflusst. Bei der Kohlenhydratdiät zeigt sich in der Auftragung U pro g Leber ein leichter Anstieg der Aktivität bis auf einen Maximalwert, der um etwa 41% über dem Ausgangswert liegt. Dieser Anstieg ist jedoch nicht durch eine Änderung der Enzymmenge bedingt, sondern ist eine Folge der Änderung der Lebergewichte (siehe 5.1.3.), und stellt nur eine Konzentrationsänderung der Pyruvatkinase dar. Mit dem Absinken der Lebergewichte ab 4⁰⁰ steigt die Konzentration der Pyruvatkinase pro g Leber an. Die Gesamtmenge der Pyruvatkinase in der Leber zeigt dagegen keine signifikanten Schwankungen. Bei der Auftragung U pro Gesamtleber wird dies deutlich. Der Einfluß der Lebergewichtsänderungen auf die 24-Stunden-Profile der Pyruvatkinaseaktivität der proteinreich ernährten Ratten ist minimal, da bei diesen Tieren die Lebergewichtsschwankungen viel geringer sind als bei den kohlenhydratreich ernährten Ratten.

Ein weiterer Punkt unserer Untersuchung betraf die Bestimmung der Menge an löslichem Protein pro Leber und der Bezug der Enzymaktivität der Pyruvatkinase auf mg lösliches Protein. Bei Eiweißdiät zeigt der Proteingehalt pro Leber circadiane Schwankungen. Mit Beginn der

Freßperiode ist ein Anstieg feststellbar, der ab 6⁰⁰ von einem Absinken gefolgt wird, um dann die Ausgangswerte in etwa wieder zu erreichen. Bei Kohlenhydratdiät sind keine signifikanten Schwankungen festzustellen. Der Anstieg des Gehalts an löslichem Protein in der Leber bei Proteindiät ist leicht zu erklären. Nach Aufnahme der Proteine in den Digestionstrakt kommt es, nach ihrer enzymatischen Aufspaltung in Aminosäuren und der anschließenden Resorption aus dem Darm, zu einer starken Zunahme der Aminosäuren im Pfortaderblut. Die Leber als zentrales Organ des Intermediärstoffwechsels nimmt einen Großteil der Aminosäuren auf und baut sie zu Plasmaproteinen und lebereigenen Proteinen um. Ein Teil der Aminosäuren wird auch zu den entsprechenden Ketocarbonsäuren umgewandelt. So ist es leicht erklärlich, daß der Proteingehalt in den Lebern der eiweißreich ernährten Ratten um durchschnittlich 40-50% größer ist als bei Kohlenhydratdiät.

Der Bezug U pro mg lösliches Protein, also die spezifische Aktivität eines Enzyms, verdeutlicht die Bedeutung dieses Enzyms für den Stoffwechsel, insbesondere, wenn es sich wie im Fall der Pyruvatkinase um ein Schrittmacherenzym handelt. Die spezifische Aktivität der Pyruvatkinase liegt bei den kohlenhydratreich ernährten Tieren 4 bis 5 mal höher als bei den mit Eiweiß gefütterten Ratten. Die Zelle paßt sich der glykolytischen Stoffwechsellage an, indem sie die Pyruvatkinase, als Schrittmacherenzym der Glykolyse, in ihrer spezifischen Aktivität erhöht, trotz der durch Kohlenhydratdiät verminderten zellulären Eiweißkonzentration. Circadiane Schwankungen der spezifischen Aktivität zeigen sich bei beiden Diäten nicht. Im Vergleich zur

Auftragung U pro Gesamtleber, zeigt der Graph für die Proteindiät einen noch geradlinigeren Verlauf. Bei der Kohlenhydratdiät verläuft die Kurve, da der Proteingehalt relativ konstant ist, wie bei der Auftragung der Aktivität pro Gesamtleber. Also auch hier keine signifikanten Schwankungen. Da, wie festgestellt, die Aktivität der Pyruvatkinase, und somit die Enzymmenge, keinen circadianen Schwankungen unterliegt, sind die Schwankungen des Gehalts an löslichem Protein auf Veränderungen von Fremdproteinen zurückzuführen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß keine Aktivitätsänderungen, sowohl der Gesamtaktivität als auch der spezifischen Aktivität, der Pyruvatkinase festzustellen sind, die auf das Freßverhalten zurückzuführen wären, und somit einer circadianen Rhythmik unterlägen.

Es stellt sich nun die Frage, ob neben den nachgewiesenen langfristigen Anpassungsvorgängen an Ernährungsumstellungen, die auf Veränderungen der Enzymkonzentration in der Zelle beruhen, die eingestellten Enzymaktivitäten noch kurzfristig verändert werden können. Wie L. Engström, O. Ljungström und G. Hjelmquist (22) in ihren in vitro Untersuchungen zeigen konnten, ist bei gereinigter Pyruvatkinase Typ L aus Rattenlebern eine kovalente enzymatische Interkonvertierung möglich, die das Enzym im Sinne einer K-Typ Modifikation beeinflusst. Durch eine cyclo-AMP-abhängige Phosphorylierung wird die Aktivität des Enzyms erniedrigt, besonders deutlich bei geringen Phosphoenolpyruvatkonzentrationen. Nach diesen Untersuchungsergebnissen gehört die Pyruvatkinase Typ L also zu den Enzymen, die

durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen reguliert werden können. In einer weiteren in vitro Untersuchung konnten V.P.K. Titanji, Ö. Zetterqvist und L. Engström (48) diese Hypothese noch durch die Tatsache untermauern, daß phosphorylierte Pyruvatkinase durch Dephosphorylierung mittels einer Histophosphatase aus Rattenleber ihre volle Aktivität zurückerlangt. H. Ishibashi und G.L. Cottam (49) zeigten, daß Glucagon in vivo, über cyclo-AMP und eine cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase, eine Phosphorylierung der Pyruvatkinase und damit eine Inaktivierung bewirkt. J.E. Feliu et al. (50), T.J.C. van Berkel et al. (51, 52) sind mit ihren Beobachtungen damit im Einklang. S.J. Pilkis et al. (53) kamen in ihren Untersuchungen der Pyruvatkinase aus Rattenlebern zu der Annahme, daß hormonell bedingte Änderungen der Konzentration von Fructose-1,6-bisphosphat und Phosphoenolpyruvat den Phosphorylierungszustand der Pyruvatkinase in der Zelle beeinflussen.

Bei unserer Untersuchung wurde zur Feststellung kurzfristiger Regulierungsvorgänge der Pyruvatkinase Typ L aus Rattenlebern in vivo, die Messung des Quotienten $v/v_{\max}$ herangezogen. Wie schon im Kapitel 4.4.1.2. erläutert, ist von einer Änderung dieses Quotienten, auf eine Änderung des $K_{0,5}$ -Wertes der Pyruvatkinase zu schließen und damit auf eine Veränderung der Affinität des Enzyms zum Substrat Phosphoenolpyruvat. Nach den bisherigen Erkenntnissen kann man eine solche Veränderung einer Phosphorylierung oder Dephosphorylierung

des Enzyms zuschreiben. Bei unserer Arbeit zeigt sich bei den mit Proteindiät gefütterten Ratten im 24-Stunden-Profil keine signifikante Änderung des Quotienten $v/v_{\max.}$. Beim 24-Stunden-Profil der kohlenhydratreich ernährten Ratten tritt eine auffällige Erhöhung des Quotienten $v/v_{\max.}$ auf, die ihr Maximum um 23⁰⁰ erreicht. Diese starke Schwankung steht in eindeutigem Zusammenhang mit der Aufnahme der Kohlenhydratdiät. Der Anstieg erfolgt mit Beginn der Nahrungsaufnahme, der Abfall beginnt nach 23⁰⁰, zu jenem Zeitpunkt also, zu dem die Ratten ihre Freßperiode beenden (siehe Mäggengewichte 5.1.2.). Unter Anwendung der Hill-Gleichung⁺⁾ ist es möglich, aus dem Quotienten $v/v_{\max.}$, der Phosphoenolpyruvatkonzentration (in unserem Fall 2,05 mM) und dem Hill-Koeffizienten n , der die Kooperativität der Pyruvatkinase Typ L für Phosphoenolpyruvat ausdrückt, den $K_{0,5}$ -Wert zu berechnen. Verwendet man den von Hannappel (38) für Pyruvatkinase Typ L aus Rattenleber ermittelten Wert des Hill-Koeffizienten $n = 2,7$, so findet man, daß um 20⁰⁰, kurz vor der Nahrungsaufnahme, der $K_{0,5}$ -Wert 3,05 mM beträgt, um 23⁰⁰, wenn der Quotient $v/v_{\max.}$ seinen Höchstwert erreicht, nur noch 2,22 mM. Bei dieser Affinitätsvergrößerung des Enzyms könnte es sich um eine Verringerung des Phosphorylierungsgrades handeln, da in der Literatur (22,49,53) beschrieben ist, daß der $K_{0,5}$ -Wert der Pyruvatkinase Typ L durch eine cyclo-AMP-abhängige Phosphorylierung zu höheren Konzentrationen verschoben wird.

$$+) \quad \frac{v}{v_{\max.}} = \frac{[\text{PEP}]^n}{[\text{PEP}]^n + K_{0,5}^n}$$

Es zeigt sich also, daß bei reiner Kohlenhydrater-nährung, also glykolytischer Stoffwechsellaage, zusätzlich zu den langfristigen Aktivitätsänderungen durch Zunahme der Enzymmenge, kurzfristige Regulationsmecha-nismen vorhanden sind. Das bedeutet, daß in der Leber-zelle, bei plötzlich anflutenden großen Mengen von Kohlenhydraten die Umsatzrate der Pyruvatkinase rasch gesteigert werden kann. So scheint also die Pyruvat-kinase auch kurzfristig die Glykolysegeschwindigkeit, entsprechend der momentanen Stoffwechselsituation, beeinflussen zu können.

Am 24-Stunden-Profil des Plasmainsulinspiegels fällt auf, daß bei den Ratten, die kohlenhydratreich gefüttert wurden, die Insulinkonzentrationen durchwegs unter den Werten der Proteindiät liegen. Ein solches niedriges Niveau des Insulinspiegels stellte auch Trump (35) bei längerdauernder Kohlenhydraternährung fest. Der geringe Insulinspiegel und der, besonders im Vergleich zur Proteindiät, geringe Anstieg der Spiegel bei der Aufnahme von Kohlenhydraten steht im Einklang mit den Beobach-tungen von Young et al. (36) und Eaton et al. (34). Sie stellten fest, daß bei proteinarmer und kohlenhydrat-reicher Ernährung von Ratten ein verminderter Insulin-spiegel und gleichzeitig auch eine verminderte Insulin-antwort auf Glucosebelastung auftritt. Der extrem star-ke Anstieg des Plasmainsulinspiegels bei der Protein-diät, nach Beginn der Nahrungsaufnahme, bis zum Maxi-malwert um 23^{00} (8-9fach höher als Ausgangsniveau), ist im Vergleich zur Kohlenhydratdiät erstaunlich. Die-ses Ergebnis steht mit den Beobachtungen Trumps (35) im Einklang, der nach eiweißreicher Diät eine starke Erhöhung des Insulinspiegels im Blut nachweisen konnte.

Miller (54) und Felig (55) stellten fest, daß die verzweigtkettigen Aminosäuren einen kräftigen Anstieg des Insulinspiegels hervorrufen können. Insbesondere scheint Leucin bzw. sein α -Ketoanalog die Insulinsekretion anzuregen (56).

Der Plasmainsulinspiegel weist, wie unsere Untersuchung zeigt, eine circadiane, nahrungsbedingte Rhythmik auf. Trump (35), der auch das circadiane Verhalten des Insulins untersuchte, kam allerdings zu anderen Ergebnissen. Er fand Maxima des Insulinspiegels um 8⁰⁰ und 24⁰⁰. Die von ihm gemessenen Insulinspiegel liegen deutlich über den von uns gemessenen. Es ist jedoch unmöglich hier direkte Vergleiche anzustellen, da er unter völlig anderen Versuchsbedingungen arbeitete. So wurden in seinen Versuchen die Ratten nur mit Normaldiät gefüttert, und das auch während des 24-Stunden-Profiles (Meßpunkt alle 4 Stunden) ad libitum. Mit anderen in der Literatur berichteten Werten stimmen die von uns gefundenen niedrigeren Werte besser überein (57,58,59).

Die Enzymaktivität der Pyruvatkinase bleibt trotz Schwankungen des Insulinspiegels immer konstant. Die beim 24-Stunden-Profil des Quotienten $v/v_{\max}$ auftretenden Schwankungen sind ebenfalls nicht mit dem Insulin in Zusammenhang zu bringen. Der Insulinspiegel hat seinen extrem hohen Wert bei den proteinreich ernährten Ratten um 22⁰⁰. Im 24-Stunden-Profil des Quotienten $v/v_{\max}$ ist jedoch keine auffällige Schwankung festzustellen. Bei der Kohlenhydratdiät kommt das relativ niedere

Insulinmaximum um 23⁰⁰ wahrscheinlich nicht als Ursache für den starken Affinitätsanstieg der Pyruvatkinase in Frage, da ja das wesentlich höhere Maximum des Insulinspiegels bei der Proteindiät keinerlei Auswirkung auf die Pyruvatkinase zeigt.

Eine Korrelation zwischen den circadianen Schwankungen des Plasmainsulinspiegels und der Pyruvatkinaseaktivität bzw. der Pyruvatkinaseaffinität ist nicht festzustellen. Dies wird in der Literatur bestätigt. H. Ishibashi und G.L. Cottam (49) stellten in ihren Untersuchungen über die cyclo-AMP-abhängige Phosphorylierung der Pyruvatkinase fest, daß Insulin keinen Einfluß auf die katalytische Aktivität der Pyruvatkinase besitzt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei 72 Tage alten Ratten, die extrem kohlenhydratreich bzw. proteinreich ernährt wurden, der Plasmainsulinspiegel und die Aktivität der Pyruvatkinase einer circadianen Rhythmik unterliegen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die beobachteten ernährungsbedingten hohen bzw. niedrigen Enzymaktivitäten, die auf Änderungen der zellulären Enzymkonzentration beruhen, noch zusätzlich durch kurzfristige Regulationsmechanismen verändert werden können. Außerdem war die Frage zu klären, ob zwischen den möglichen circadianen Schwankungen des Insulinspiegels und der Pyruvatkinaseaktivität eine positive Korrelation besteht.

Es können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die Aktivität der Pyruvatkinase zeigt sowohl bei Fütterung mit Proteindiät, als auch mit Kohlenhydratdiät, keine signifikanten circadianen Schwankungen. Die zelluläre Enzymaktivität in der Leber liegt bei den Ratten, die mit Kohlenhydraten gefüttert wurden, deutlich über der proteinreich ernährten Ratten.
2. Die Affinität der Pyruvatkinase Typ L zu Phosphoenolpyruvat in der Leber von Ratten, die mit Kohlenhydratdiät ernährt wurden, zeigt eine von der Nahrungsaufnahme abhängige, kurzfristig einsetzende Zunahme, die nach Beendigung der Freßzeit ebenso rasch wieder abfällt. Bei Proteindiät ist keine nahrungsbedingte Affinitätsveränderung festzustellen.

3. Der Plasmainsulinspiegel zeigt Schwankungen in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme. Bei Proteinzufuhr ist der Anstieg der Insulinmenge im Plasma wesentlich größer als bei Kohlenhydratzufuhr. Die Insulinkonzentration im Plasma ist bei proteinreicher Ernährung durchwegs höher als bei kohlenhydratreicher Ernährung.
4. Es besteht keine positive Korrelation zwischen Plasmainsulinspiegel und Aktivität bzw. Affinität der Pyruvatkinase.

8. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. T. Tanaka, Y. Harano, F. Sue, H. Morimura:
J. Biochem. (Tokyo) 62, 71-91 (1967)
2. J. Carbonell, J.E. Feliu, R. Marco, A. Sols:
Eur. J. Biochem. 37, 148-156 (1973)
3. F.A. Farina, J.B. Shatton, H.P. Morris, S. Weinhouse:
Cancer Res. 34, 1439-1446 (1974)
4. K.H. Ibsen, E. Krueger:
Arch. Biochem. Biophys. 157, 509-513 (1973)
5. K.H. Ibsen, P. Trippet:
Arch. Biochem. Biophys. 156, 730-744 (1973)
6. K. Imamura, T. Tanaka:
J. Biochem. (Tokyo) 71, 1043-1051 (1972)
7. K. Imamura, T. Tanaka, T. Nishima, N. Nakashima,
S. Miwa: J. Biochem. (Tokyo) 74, 1165-1175 (1973)
8. H.B. Burch, O.H. Lowry, S.G. Perry, L. Fan,
S. Fagioli: Am. J. Physiol. 226, 1227-1231 (1974)
9. D.M. Crisp, C.I. Pogson:
Biochem. J. 126, 1009-1023 (1972)
10. Th.J.C. van Berkel, J.F. Koster, W.C. Hülsmann:
Biochem. Biophys. Acta 276, 425-429 (1972)

11. S. Yanagi, S. Makiura, M. Arai, K. Matsumura,
K. Hirao, N. Ito, T. Tanaka:
Cancer Res. 34, 2283-2289 (1974)
12. R.A. Freedland, T.L. Cunliffe, J.G. Zinkl:
J. Biol. Chem. 241, 5448-5451 (1966)
13. A.E. Roggeveen, R.W. Geisler, D.E. Peavy, R.J. Hansen:
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147, 467-470 (1974)
14. H.A. Krebs, L.V. Eggleston:
Biochem. J. 94, 3c-4c (1965)
15. O.D. Taunton, F.B. Stifel, H.L. Greene, R.H. Herman:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 1663-1670 (1972)
16. O.D. Taunton, F.B. Stifel, H.L. Greene, R.H. Herman:
J. Biol. Chem. 249, 7228-7239 (1974)
17. F.B. Stifel, O.D. Taunton, H.L. Greene, R.H. Herman:
J. Biol. Chem. 249, 7240-7244 (1974)
18. J.B. Blair, M.A. Cimbala, J.L. Foster, R.A. Morgan:
J. Biol. Chem. 251, 3756-3762 (1976)
19. J.E. Feliu, L. Hue, H.-G. Hers:
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2762-2766 (1976)
20. Th.J.C. van Berkel, J.K. Kruijt, J.F. Koster,
W.C. Hülsmann: Biochem. Biophys. Res. Comm. 72,
917-925 (1976)

21. J.P. Riou, T.H. Claus, S.J. Pilakis:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 73, 591-598 (1974)
22. O. Ljungström, G. Hjelmquist, L. Engström:
Biochim. Biophys. Acta 358, 289-298 (1974)
23. B. Hess, R. Haeckel, K. Brand:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 824-831 (1966)
24. T. Tanaka, F. Sue, H. Morimura:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 444-449 (1967)
25. C.B. Taylor, E. Bailey:
Biochem. J. 102, 32c-33c (1967)
26. G. Weber, M.A. Lea, H.J.H. Convery, N.B. Stamm:
Advan. Enzyme Regul. 5, 257-298 (1967)
27. W. Seubert, H.V. Henning, W. Schoner, M. L'age:
Advan. Enzyme Regul. 6, 153-178 (1968)
28. K.H. Ibsen, P. Trippet:
Arch. Biochem. Biophys. 163, 570-580 (1974)
29. H. Carminatti, L.J. de Asúa, E. Recondo, S. Passeron,
F. Rozengurt: J. Biol. Chem. 243, 3051-3056 (1968)
30. W. Flory, B.D. Peczon, R.E. Koeppe, H.O. Spivey:
Biochem. J. 141, 127-131 (1975)
31. K.D. Buchanan, J.E. Vance, R.H. Williams:
Metabolism 18, 155-162 (1969)

32. B. Szepesi, C.D. Bernandier, S.K. Diachenko,
P.B. Moser: J. Nutr. 101, 1147-1152 (1971)
33. N. Carmel, A.M. Konijn, N.A. Kaufmann, K. Guggenheim:
J. Nutr. 105, 1141-1149 (1975)
34. R.P. Eaton, D.M. Kipnis, I. Karl, A.B. Eisenstein:
Am. J. Physiol. 227, 101-104 (1974)
35. F.G. Trump:
Diss. im Fachbereich Medizin, Erlangen (1978)
36. V.R. Young, G. Vilaire, P. Newbern, R.B. Wilson:
J. Nutr. 103, 720-729 (1973)
37. W. Krone, W.B. Huttner, H.J. Seitz, W. Tarnowski:
Biochim. Biophys. Acta 437, 62-70 (1976)
38. E. Hannappel:
Diss. im Fachbereich Naturwissenschaften,
Erlangen (1978)
39. Prospekt der Firma Altromin
Lange Straße 40, 4937 Lage
40. S. Passeron, L.J. de Asúa, H. Carminatti:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 33-38 (1967)
41. A. Kupfer:
Diss. im Fachbereich Medizin, Erlangen (1977)
42. T. Bücher, G. Pfeleiderer:
Methods in Enzymology 1, 435-440 (1955)

43. R.S. Yalow, S.A. Berson:
J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960)
44. A.G. Gornall, C.S. Bardawill, M.M. David:
J. Biol. Chem. 177, 751-766 (1949)
45. P.A. Edwards, R.G. Gould:
J. Biol. Chem. 249, 2891-2896 (1974)
46. K. Nagai, M. Suda, H. Nakagawa:
J. Biochem. 74, 863-871 (1973)
47. K. Nagai, M. Suda, O. Yamagishi, Y. Toyama,
H. Nakagawa: J. Biochem. 77, 1249-1254 (1975)
48. V.P.K. Titanji, Ö. Zetterqvist, L. Engström:
Biochim. Biophys. Acta 422, 98-108 (1976)
49. H. Ishibashi, G.L. Cottam:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 85, 900-905 (1978)
50. J.E. Feliu, L. Hue, H.-G. Hers:
J. Biochem. 81, 609-617 (1977)
51. T.J.C. van Berkel, J.K. Kruijt, J.F. Koster:
J. Biochem. 81, 423-432 (1977)
52. T.J.C. van Berkel, J.K. Kruijt, G.B. van den Berg,
J.F. Koster: J. Biochem. 92, 553-561 (1978)
53. S.J. Pilkis, J. Pilkis, T.H. Claus:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 81, 139-146 (1978)

54. L.L. Miller:
The Amino Acid Pools (T.J. Holden Hrsg.),
708-721 (1962)
55. P. Felig:
Metabolism 22, 179-207 (1973)
56. J.C. Floyd, S.S. Fajans, J.W. Coun, R.F. Knopf,
J. Rall: J. Clin. Invest. 45, 1487
57. L. Kaul, C.D. Bernandier:
J. Nutr. 105, 1132-1140 (1975)
58. E. Blázquez, C.L. Quijada:
J. Endocrinol. 42, 489-494
59. B. Szepesi, C.D. Bernandier:
J. Nutr. 101, 1563- 1574 (1971)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl II, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Brand und Herrn Dr. E. Hannappel durchgeführt.

Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. K. Brand für die Überlassung des Themas und die wohlwollende Förderung meiner Arbeit durch konstruktive Kritik und tatkräftige Unterstützung. Ebenso danke ich Herrn Dr. E. Hannappel, dessen Rat und Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche und der Auswertung der Ergebnisse eine große Erleichterung für mich waren. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Weigand für seine freundliche Unterstützung und Frl. Ostermann für ihre Unterweisung in der Technik der Radioimmunbestimmung des Insulins. Meinem Studienkollegen Herrn Hans-Peter Zimmermann danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Proben. Ferner möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für ihre freundliche Unterstützung bedanken.

Lebenslauf

Ich wurde am 8. Juni 1954 als erstes Kind des technischen Angestellten Horst Zahlmann und seiner Frau Erna, geb. Mann, in Arzberg geboren. Von 1960-1964 ging ich in die Volksschule in Arzberg. Daran anschließend besuchte ich den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Otto-Hahn-Gymnasiums in Marktredwitz, wo ich 1973 das Abitur ablegte. Nach meiner Wehrdienstzeit begann ich im Sommersemester 1975 das Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Nach dem 2. Semester legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach dem 5. Semester die zahnärztliche Vorprüfung ab. Im August 1978 begann ich mit der vorliegenden Arbeit. Im Juli 1980 schloß ich mein Studium mit dem Staatsexamen ab.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197